

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-192195

(43)Date of publication of application : 03.08.1993

---

(51)Int.Cl. C12Q 1/68  
C12N 15/10  
// C12Q 1/44  
C12Q 1/48

---

(21)Application number : 04-016682 (71)Applicant : BECTON DICKINSON & CO

(22)Date of filing : 31.01.1992 (72)Inventor : WALKER GEORGE T

---

(30)Priority

Priority number : 91 648257 Priority date : 31.01.1991 Priority country : US  
92 819358 09.01.1992 US

---

## (54) STRAND DISPLACEMENT AMPLIFICATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To carry out a strand displacement amplification by reacting a predetermined reaction mixture with a single strand fragment.

CONSTITUTION: A nucleic acid containing a target sequence is isolated from a sample and heat-treated to give a single strand fragment (A). Then, an excessive amount of at least monosubstituted deoxynucleoside triphosphate is mixed with a DNA polymerase deficient in 5' → 3' exonuclease activity, plural primers complementary to the single strand of the target sequence and having a recognition sequence at 5' end and an endonuclease capable of cleaving the recognition sequence in the primers to give a reaction mixture (B). Then, a fixed sample is mixed with the components A and B and reacted for a time sufficient to form the reaction product to amplify the subject nucleic acid sequence in the sample such as a human derived biological material.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-192195

(43)公開日 平成5年(1993)8月3日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 序内整理番号 F I 技術表示箇所  
C 12 Q 1/68 A 8114-4B  
C 12 N 15/10 ZNA  
// C 12 Q 1/44 6807-4B  
1/48 6807-4B  
8931-4B C 12 N 15/00 A  
審査請求 有 請求項の数10(全 14 頁)

(21)出願番号 特願平4-16682

(22)出願日 平成4年(1992)1月31日

(31)優先権主張番号 6 4 8 2 5 7

(32)優先日 1991年1月31日

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 8 1 9 3 5 8

(32)優先日 1992年1月9日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591007332

ベクトン・ディッキンソン・アンド・カン  
パニー

BECTON DICKINSON AND COMPANY

アメリカ合衆国ニュージャージー州07417  
-1880, フランクリン・レイクス, ワン・

ベクトン・ドライブ (番地なし)

(72)発明者 ジョージ・ティー・ウォーカー  
アメリカ合衆国ノース・カロライナ州  
27514, チャペル・ヒル, マウント・ボラ  
ス・ロード 209

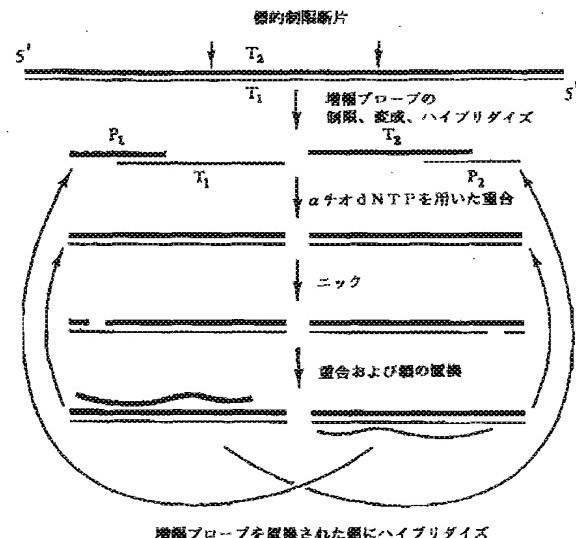
(74)代理人 弁理士 湯浅 基三 (外6名)

(54)【発明の名称】 鎖置換型増幅法

(57)【要約】

【目的】本発明は核酸標的物の増幅法に関する。

【構成】単一温度において操作し、合成された鎖にニックを入れるエンドヌクレアーゼをポリメラーゼと共に使用して、該ポリメラーゼが消化することなく、鎖を外して、かつ、その間に新たな合成鎖を生じさせるように核酸標的物の増幅を実施する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 少なくとも一つが置換された過剰量のデオキシヌクレオシド3'リン酸、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼ、標的配列の一本鎖に相補的で5'末端にエンドヌクレアーゼのための認識配列を有する複数のプライマー、および前記プライマー中の認識配列を切断できるエンドヌクレアーゼからなる反応混合物を標的核酸配列に添加し、そして  
b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物と一本鎖断片を反応させる

段階からなる、標的核酸配列の增幅法。

【請求項2】 標的配列が二本鎖であり、段階a)の前に上記二本鎖を一本鎖にすることからなる、特許請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損クレノー断片およびBstポリメラーゼのクレノー断片からなるグループから選択される、特許請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項4】 エンドヌクレアーゼが、Nci I, Ava I, Hinc II およびFnu4H I からなるグループから選択される、特許請求の範囲第3項記載の方法。

【請求項5】 a) 試料から核酸を単離し、  
b) 試料に制限酵素を添加することにより二本鎖核酸断片を調製し、  
c) 試料を加熱することにより一本鎖核酸断片を生成し、  
d) 少なくとも一つが置換された過剰量のデオキシヌクレオシド3'リン酸、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、標的配列の一本鎖に相補的で5'末端に認識配列5'GTPyPuAC3'を有する複数のプライマー、およびHinc II からなる反応混合物を添加し、  
e) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物と一本鎖断片を反応させ、そして  
f) 生産された反応産物の存在を検出する

段階からなる、ヒト由来の生物学的材料の試料中の標的核酸配列の增幅法。

【請求項6】 a) コピーすべき核酸配列のひとつまたは複数の一本鎖断片を調製し、  
b) 少なくとも一つが置換された過剰量のデオキシヌクレオシド3'リン酸、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼ、標的配列の一本鎖に相補的で5'末端にエンドヌクレアーゼのための認識配列を有するプライマー、および前記プライマー中の認識配列を切断できるエンドヌクレアーゼからなる反応混合物を標的核酸配列に添加し、そして  
c) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物と一本鎖断片を反応させる

段階からなる、一つの核酸配列を高コピー数生成する方法。

【請求項7】 a) 過剰量のデオキシヌクレオシド3'リン酸、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼ、標的配列の一本鎖に相補的で5'末端にエンドヌクレアーゼのための認識配列を有する複数のプライマー、および前記プライマー中の認識配列の一方の鎖のみを切断できるエンドヌクレアーゼからなる反応混合物を標的核酸配列に添加し、そして

b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物と一本鎖断片を反応させる段階からなる、標的核酸配列の增幅法。

【請求項8】 a) 試料から核酸を単離し、

b) 試料中の核酸の二本鎖核酸断片を調製し、  
c) 一本鎖核酸断片を生成し、

d) 過剰量のデオキシヌクレオシド3'リン酸、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼ、標的配列の一本鎖に相補的でエンドヌクレアーゼのための認識配列を含む5'末端を有する複数のプライマー、および前記プライマー中の認識配列の一方の鎖のみを切断できるエンドヌクレアーゼからなる反応混合物を標的核酸配列に添加し、

e) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物と一本鎖断片を反応させ、そして  
f) 生産された反応産物の存在を検出する

段階からなる、生物学的材料の試料中の標的核酸配列の增幅法。

【請求項9】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損クレノー断片およびBstポリメラーゼのクレノー断片からなるグループから選択される、特許請求の範囲第8項記載の方法。

【請求項10】 a) コピーすべき核酸配列のひとつまたは複数の一本鎖断片を調製し、

b) 過剰量のデオキシヌクレオシド3'リン酸、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼ、標的配列の一本鎖に相補的で5'末端にエンドヌクレアーゼのための認識配列を有するプライマー、および前記プライマー中の認識配列の一方の鎖のみを切断できるエンドヌクレアーゼからなる反応混合物を標的核酸配列に添加し、そして

c) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物と一本鎖断片を反応させる

段階からなる、一つの核酸配列を高コピー数生成する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、標的核酸配列の増幅法に関する、特定すればエンドヌクレアーゼを介する鎖の置換による増幅法および増幅された反応産物の検出法に関する。本発明はさらに、本出願と同日出願のエキソヌクレアーゼを介した鎖置換型増幅法のために共通に属する

使用法に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸は、デオキシリボ核酸（D N A）またはリボ核酸（R N A）のいずれかの形態である。D N AおよびR N Aは、多数のヌクレオチド骨格から形成される高分子量ポリマーである。各ヌクレオチドは塩基（ブリンまたはピリミジン）、糖（リボースまたはデオキシリボース）およびリン酸分子からなる。D N Aは、糖デオキシリボースおよび塩基アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）およびチミン（T）からなる。

【0003】核酸は直鎖状に連結されて遺伝子コードを構成する。3つのヌクレオチド各々の配列は、翻訳の過程において一つのアミノ酸のためのコードとして読まれる。（D N Aは転写の過程においてR N Aに変換される。）それぞれの3つの塩基配列内の塩基の組み合わせを変えることにより、別のアミノ酸がコードされる。さまざまな3つの塩基配列の連結により、アミノ酸配列は蛋白質を構成できる。一つの蛋白質の完全なコードユニットは遺伝子と呼ばれる。ひとつまたは複数の遺伝子コピーが一つの生物内に存在しうる。幾つかの遺伝子は数百から数千コピー存在する。他の遺伝子は通常單一コピーで存在する。

【0004】コピー数にかかわらず、遺伝子は一つの生物内で連結されて、高等生物においては染色体と呼ばれるより高度な構造単位が構成される。幾つかの下等生物においては、プラスミドと呼ばれる染色体外ユニットの遺伝子が存在する。遺伝子は互いに直接末端同士で連結される必要はない。特定の非コード領域（即ちアミノ酸に翻訳されない塩基配列）が遺伝子間または遺伝子内において存在する。即ち、特定の生物のヌクレオチド配列はゲノムと呼ばれるその生物の遺伝子構造を決定する。（したがって、ひとつの生物から単離されたD N AはゲノミックD N Aと呼ばれる。）ほとんどの生物のD N Aは、二本鎖の形で形成されており、D N Aの二本の鎖は、接近した二重らせんにより対になっている。このモデルにおいて、対合している鎖同士はAとTおよびCとGの間で水素結合を形成している。即ち、一方の鎖の配列がA T C G（5' → 3'）であれば相補鎖はT A G C（3' → 5'）となる。しかしながら、両方の鎖は相補的な塩基対合様式においてのみ同じ遺伝子コードを含む。したがって、いずれかのD N A鎖が読めれば、コードしている方の遺伝子配列が決定される。

【0005】核酸の配列、構造および機能のさらなる記述はワトソン（Watson）、Molecular Biology of the Gene、ベンジャミン（W. J. Benjamin）、Inc.（第3版、1977年）の特に6章-14章を参照せよ。

【0006】試料中に存在する核酸の遺伝子配列の理解および決定は、多くの理由から重要である。第一に、多

くの疾患は正常な遺伝子のヌクレオチド配列が幾つかの様式により変化を受けるという意味において遺伝的なものである。そのような変化は、ひとつの塩基が別の塩基に置換されることにより生じる。3つの塩基が一つのアミノ酸を供給するので、一つの塩基の変化（点突然変異とよばれる）が一つのアミノ酸の変更をもたらし、正常な蛋白質の代わりに欠損蛋白質が細胞内で作られる。鎌形赤血球貧血症は、一つの遺伝子内の一つの塩基の変化により引き起こされる、そのような遺伝的欠損の古典的な例である。一つの遺伝子の欠損により引き起こされる疾患の例は、第IX因子欠損および第VIII因子欠損、アデノシンデアミナーゼ欠損、プリンヌクレオチドホスホリラーゼ欠損、オルニチントランスクカルバミラーゼ欠損、アルギニンスクシネートシターゼ欠損、ベータサラセミア、α<sub>1</sub>抗トリプシン欠損、グルコセレブロシダーゼ欠損、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ欠損およびヒポキサンチシングアニンホスホリボシルトランスクフェラーゼ欠損を含む。さらに他の疾患、例えば癌は、活性化、転座、転移、コピー数の増加および／またはオンコジーンと呼ばれる、ゲノム内に存在することが知られている遺伝子のサプレッションの除去により引き起こると信じられている。特定の癌について明らかであると信じられているオンコジーンの例は、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫および小細胞肺癌のN-mycおよび慢性骨髓性白血病のc-ablを含む。癌の診断に関するオンコジーンの関連記述および特定のオンコジーンのリストはワインバーグ（Weinberg）、Sci. Amer., 1983年11月、スラモン（Slamon）ら、Science, 224:256(1984)、米国特許第4,699,877号および第4,918,162号を参照せよ。

【0007】第二に、核酸の配列の変化に加えて、構造的なレベルで生じる遺伝的な変化がある。そのような変化は、挿入、欠失および染色体内の転座を含み、また染色体数の増加または減少を含む。前者の例として、そのような変化は交差と呼ばれる現象によりもたらされ、一つの染色体D N Aの鎖がさまざまな長さの別の染色体D N Aと交換される。即ち、例えば正常な個体において、蛋白質Xの遺伝子が第1染色体に存在する場合、交差後にその遺伝子が第4染色体に転座し（第4染色体から第1染色体への同様な交換があつてもなくとも）、細胞はXを生産しない。

【0008】染色体数の増加または減少例（異数性：aneuploidyと呼ばれる）において、各々の正確な染色体コピー数を有する正常な個体の代わりに（例えば、XおよびY染色体以外の二本のヒト染色体）、違う数になる。例えばヒトにおいては、ダウン症候群は正常な2コピーの代わりに第21染色体を3コピー有する結果になる。他の異数体状態は第13染色体と第18染色体を含むトリソミーによりもたらされる。

【0009】第三に、感染性疾患は、寄生虫、微生物およびウイルスにより引き起こされ、それらすべては自分の核酸を有する。生物学的材料の試料中のこれら生物の存在は、しばしば多くの慣用的な方法（例えば培養）により測定される。しかしながら、各々の生物は自分のゲノムをもっているために、単一の種（幾つかの近縁種、属またはより高いレベルの近縁種）に特定の核酸の遺伝子または配列があれば、ゲノムはそれらの生物（または種等々）に「跡（フィンガープリント）」を供給する。本発明が適用されるウイルスの例はHIV, HPV, EBV, HSV, B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスおよびCMVを含む。本発明が適用される微生物の例はバクテリアを含み、より特定すればヘモフィルスインフルエンザ、マイコプラズマ、レジュネラ、マイコバクテリア、クラミジア、カンジダ、淋菌、赤痢菌およびサルモネラを含む。

【0010】上記の各例において、疾患または生物に特定の配列を同定することにより、その配列が存在すれば試料から核酸を単離し、そして配列を決定できる。多くの方法がこの目的のために開発されて来た。

【0011】疾患または生物に特定のひとつまたは複数の配列が同定されることが重要なことであっても、本発明の実施において標的配列が何かということまたはそれが如何にして同定されるかということは重要でない。核酸試料中の標的配列の存在を検出するためのもっとも直接的な手段は、標的配列に相補的なプローブ配列を合成することである。（装置としては例えばApplied Biosystems）380Bが、この目的のための比較的短い核酸配列を合成するために使用される。）そして合成されたプローブ配列は核酸配列を含む試料に用いることができ、そして標的配列が存在すれば該プローブはそれと反応して反応産物を生成する。標的配列がなく、そして非特異的な結合も阻止すれば、反応産物は生成されない。合成プローブを検出可能な標識物で標識すれば、反応産物は標識物の存在量を測定することにより検出できる。サザンブロッティングは、この方法が使用される一つの例である。

【0012】しかしながら、このアプローチの困難性は、試料中に存在する標的配列のコピー数が少ない場合に（即ち、 $10^7$ 未満）容易に応用されないことである。そのような場合、シグナルとノイズを区別すること（即ち、プローブと標的配列間の真の結合と、プローブと非標的配列間の非特異的な結合を区別すること）が困難である。この問題を解決するための一つの方法はシグナルを増やすことである。したがって、試料中に存在する標的配列を増幅するために、多くの方法が述べられてきた。

【0013】最もよく知られた増幅法の一つに、ポリメラーゼチェインリアクション法（PCRと呼ばれる）が

あるが、それは米国特許第4,683,195号、第4,683,202号および第4,800,159号に詳細に記述されている。PCRにおいては、簡単に言えば標的配列の反対の相補鎖の領域に相補的な2つのプライマーを調製することである。過剰量のデオキシヌクレオシド3リン酸をDNAポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）と共に反応混合物に加える。標的配列が試料中に存在すれば、プライマーは標的配列に結合し、そしてポリメラーゼは該プライマーから標的配列に沿ってヌクレオチドを付加することにより伸長合成反応を行う。反応混合物の温度を上昇および低下させることにより、伸長合成されたプライマーは標的配列から解離することにより反応産物を生成し、そして過剰量のプライマーが標的配列および反応産物に結合することにより、反応が繰り返される。

【0014】他の増幅法は1989年6月14日に公開された欧州特許出願第320,308号に記述されており、その内容はリガーゼチェインリアクション法（LCRと呼ばれる）である。LCRにおいて、二本の相補鎖プローブの対が調製され、そして標的配列の存在下において、その対が、標的配列の反対の相補鎖と結合してとなりあう。リガーゼの存在下において、2つのプローブの対が結合することにより、単一のユニットを生成する。PCRのように温度を上下させることにより、結合していた連結ユニットは標的配列から解離し、そして過剰量のプローブ対の連結のための標的配列として使用される。米国特許第4,883,750号は、LCRに類似した、プローブ対を標的配列に結合させるための方法を記述しているが、増幅段階は記述していない。.

【0015】さらに別の増幅法が、1987年10月22日に公開されたPCT出願PCT/US87/00880に記述されており、その方法はQベータレプリカーゼ法と呼ばれる。この方法によれば、標的配列に相補的な領域を有するRNAの複製型配列をRNAポリメラーゼ存在下において試料に添加する。ポリメラーゼは複製型配列をコピーし、これを次に検出できる。

【0016】さらに別の増幅法は、1988年9月21日に公開された英国特許出願第2202328号、および1989年10月5日に公開されたPCT出願PCT/US89/01025において記述されている。前者の出願は、修飾されたプライマーを用いる、PCRに類似の温度および酵素依存性合成である。プライマーは、捕捉モイエティ（Moiety）（例えばビオチン）および／または探知器モイエティ（例えば酵素）を用いて標識することにより修飾される。後者の出願においては、過剰量の標識プローブを試料に添加する。標的配列の存在下において、プローブが結合し、そして酵素により分解される。分解後、標的配列は過剰量のプローブにより結合していたときのままで解離する。標識プローブの分解は、標的配列の存在を示す。

【0017】上述のすべての方法において、さまざまな検出法が使用されるが、それらはどれも使用された増幅法に特有なものでない。一つの方法は電気泳動により特定の大きさを有する検出反応産物である。他の方法は、<sup>32</sup> Pでプローブ配列を放射標識し、そして例えば反応産物により発せられる放射活性をそのままあるいは電気泳動により検出する。さらなる方法は、プライマーに結合分子（例えばビオチン）、および酵素（例えばアルカリホスファターゼ）、蛍光染色剤（例えばフィコビリ蛋白質）またはそれらの組み合わせを添加することにより化学生的に修飾する。他の方法は、反応産物に結合し、そしてポリメラーゼ存在下において伸長合成反応される検出プライマーの開発である。この検出プライマーは上述のように放射標識により、または化学的に修飾できる。これららの方法の多くは、固相法並びに液相系に使用される。これらの方法並びに他の方法の多くは、米国特許第4,358,535号、第4,705,886号、第4,743,535号、第4,777,129号、第4,767,699号、および第4,767,700号に記述されている。

#### 【0018】

【発明が解決しようとする課題】上記の引用された増幅法それぞれは、ひとつまたは複数の限界を有する。ほとんどの増幅法において鍵となる限界は、反応産物が標的から解離するときの温度の上げ下げの必要性である。これは、増幅方法を実施するために使用する装置並びに反応産物を生成するために必要な酵素の選択の両方の限界を提起する。これら方法の他の限界は、内在性ヌクレアーゼの消化に感受性のRNA中間産物の生成、および関連する酵素の生産が困難であることを含む。そのような現存の増幅法にとって代わる別の方針が望まれる。

#### 【0019】

【課題を解決するための手段】本発明は、エンドヌクレアーゼが介する二本鎖の置換による、試料中の標的核酸配列（およびその相補鎖）の増幅法を提供する。該方法は、（1）標的配列を含むと推定される核酸を試料から単離し、（2）標的配列の一本鎖断片を生成し、（3）（a）核酸ポリメラーゼ、（b）デオキシヌクレオシド3'リン酸のうちの少なくとも一つが置換された、複数のデオキシヌクレオシド3'リン酸、および（c）標的断片の3'末端の領域に相補的で、さらに自己の5'末端に制限酵素の認識配列を有する少なくとも一つのプライマーからなる混合物を添加し、そして（4）反応産物を生じるのに十分な時間混合物を反応させることを含む。該断片が二本鎖核酸からなる場合は、該方法はさらに、核酸断片を変成させることにより一本鎖の標的配列を生成することからなる。核酸がRNAからなる場合は、RNAをDNAに変換するために逆転写酵素を使用することが好ましい。

#### 【0020】

本発明はさらに、上述の方法により生じた

10

20

30

40

反応産物の分離法および／または検出法に関する。この分離法は、磁気的な分離、膜による捕捉および固体支持体上での捕捉を含む。各方法において、捕捉モイエティは磁気ビーズ、膜または固体支持体に結合される。そしてビーズ、膜または固体支持体について、反応産物の存在または不在をアッセイできる。捕捉モイエティの例は、生成された反応産物に相補的な核酸配列およびプライマーまたは反応産物に取り込まれるリセプターに対する抗体を含む。分離系は検出系と連動していくてもしないなくてもよい。

【0021】本発明の実施において有用である検出系は、分離を要しない均一な系（ホモジニアスシステム）および不均一な系（ヘテロジニアスシステム）を含む。各系において、ひとつまたは複数の検出マーカーが使用され、好ましくは自動化された方法により、検出系からの反応または放射が監視される。均一な系の例は、蛍光偏光、酵素を介するイムノアッセイ、蛍光エネルギー転移、ハイブリダイゼーション保護（例えばアクリジニウムルミネッセンス）およびクローニングされた酵素のドナーライムノアッセイを含む。不均一な系の例は、酵素標識（例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびベーターガラクトシダーゼ）、蛍光標識（例えば酵素標識および直接の蛍光標識 [例えばフルオレセインおよびローダミン]）、ケミルミネッセンスおよびバイオルミネッセンスを含む。リポソームまたは他の袋状粒子も染色剤または他の検出可能なマーカーにより満たされて、そのような検出系において使用される。これらの系において、検出可能なマーカーは直接または間接に捕捉モイエティに結合でき、また反応産物はリガンドにより認識されうるリセプターの存在下において生成しうる。

【0022】本発明はさらに、配列分析のためのプローブまたは鑄型として機能できる増幅産物を生成する方法に関する。このフォーマットにおいて、上述の方法および段階を使用することにより、増幅産物を生成する。そして、増幅産物を処理することにより、例えば制限酵素を使用して増幅産物からニッキング酵素認識配列を除去できる。このようにして、認識配列は除去され、そして残った増幅産物は他の系において使用できるプローブとなる。

【0023】一本鎖標的断片の存在下において、プライマーはそれに相補的な標的鎖に結合する。ポリメラーゼの存在下において、ヌクレオチドおよび置換されたヌクレオチドを、標的の残りの長さに沿ってプライマーの3'末端に付加し、そしてヌクレオチドおよび置換されたヌクレオチドを、プライマー配列に沿って標的の3'末端に付加する。結果として得られる二本鎖産物は、標的鎖の3'末端に結合した置換ヌクレオチドを含む一つの配列を有するが、プライマー鎖は標的配列に相補的な、伸長合成された配列の5'末端に結合した未修飾の

配列を有する。

【0024】次にエンドヌクレアーゼはプライマー鎖の認識配列を切断し、標的配列の相補配列は切断しないが、それはその配列が置換されたヌクレオチドを含むからである。ポリメラーゼはニックの3'を伸長合成すると同時にニックの5'末端から下流を置換して、標的鎖に相補的な反応産物を生成する。

【0025】この方法は、2つのプライマーを用いても機能でき、その場合一つのプライマーは標的配列の一つの鎖に結合し、そして他方のプライマーは標的配列の相補鎖に結合する。この態様を使用すると、各反応産物が他のプライマーのための標的物として機能できることは明らかである。このようにして、増幅が対数的に続いて起こる。

【0026】本明細書において使用されているニッキングという単語は、二本鎖の認識部位内に存在する2つの鎖のうちの一つを選択的に切断することを意味する。

【0027】本発明において、標的核酸配列を含むと推定されているどのような材料からも試料が単離される。動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおけるそのような材料源は、血液、骨髄、リンパ球、硬組織（例えば、肝臓、脾臓、腎臓、肺、卵巣、等々）、唾液、便および尿からなる。他の材料源は、生物学的有機体を含むと推定されている、植物、土壤および他の材料に由来する。

【0028】これら材料からの核酸の単離は、あらゆる方法により行うことができる。そのような方法は、洗浄剤による溶解物、音波処理、ガラスピーブルズを用いた振盪攪拌およびフレンチプレスの使用を含む。幾つかの例において、単離された核酸を精製することが有利である（例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき）。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度に依存した遠心分離により実施される。

【0029】核酸が単離されたら、以後の説明の都合上ゲノミックな核酸はDNAであり、二本鎖であると想定する。そのような例において、試料中の核酸を約50bpから約500bpの断片に分解することが好ましい。これは例えば、制限酵素Hha I, Fok IまたはDpn Iにより実施される。酵素の選択および配列の長さは、標的配列がその断片中に完全に含まれるか、または標的配列の十分な部分が少なくとも断片中に存在することにより、プライマー配列の十分な結合を提供するようなものがよい。断片を生成する他の方法は、PCRおよび音波処理を含む。

【0030】この方法において使用されるプライマーは通常25ヌクレオチドから100ヌクレオチドの長さを有する。約35ヌクレオチドのプライマーが好ましい。この配列は極めて激しい条件において結合が生じるよう、実質的に標的物の配列に相同であるべきである。プ

ライマーは後の段階で使用されるニッキング酵素により認識される配列（5'末端付近）をも含むべきである。認識配列は通常、必然ではないがパリンドロームである。選択された配列は、前の段階において断片を切断するために使用された制限酵素が後の段階において使用されるニッキング酵素と同じであるようにしてもよい。

【0031】標的核酸断片が生成したら、それらを変成して一本鎖にすることにより標的鎖へのプライマーの結合を可能にさせる。反応温度を約95°Cに上昇させることは、好ましい核酸変成法である。他の方法はpHの上昇を含むが、プローブを標的物に結合させるためにpHを低下させる必要がある。

【0032】核酸を変成する前または後に、過剰量の、少なくとも一つが置換されている、4つすべてのデオキシヌクレオシド3リン酸、ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼからなる混合物を添加する。（高温により核酸を変成し、高温耐性の酵素を使用しないのならば、変成後に酵素を添加することが好ましい。）置換されたデオキシヌクレオシド3リン酸は、置換されたデオキシヌクレオチドを含む鎖の切断を阻害するが、他方の鎖の切断を阻害しないように修飾されているべきである。そのような置換されたデオキシヌクレオシド3リン酸の複数の例は、2'デオキシアデノシン5'-O-（1-チオ3リン酸）、5-メチルデオキシシチジン5'-3リン酸、2'一デオキシウリジン5'-3リン酸および7-デアザ-2'一デオキシグアノシン5'-3リン酸を含む。

【0033】標的の生成およびSDAのための反応成分からなる混合物は、場合によりNMP（1-メチル2ピロリジノン）、グリセロール、ポリ（エチレングリコール）、ジメチルスルホキシドおよび／またはホルムアミドを含みうる。そのような有機溶媒の含有はバックグラウンドのハイブリダイゼーション反応を軽減する助けとなると信じられている。

【0034】デオキシヌクレオチドの置換は鎖へ取り込まれた後に実施することも可能であることは、認識されるべきである。例えば、M. Tag Iのようなメチラーーゼを使用することにより、合成鎖にメチル基を付加できる。メチル基がヌクレオチドに付加されると置換され、そしてチオ置換ヌクレオチドと同様に機能する。

【0035】すべてのヌクレオチドが置換されれば、ポリメラーゼは5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠く必要はないことも理解されるべきである。合成鎖のいたるところでの置換体の存在は、系を不活性化することなしにそのような活性を阻害するために作用する。

【0036】プライマーに取り込まれた認識配列の選択において記述されたように、この方法において使用されるエンドヌクレアーゼは、認識配列の3'（または5'）において鎖を切断するように選択すべきである。さらにエンドヌクレアーゼは、ポリメラーゼの存在

により標的鎖内に生成する相補的な認識配列を切断しないように選択され、さらに合理的な速度でニックの入った認識配列を解離するように選択されるべきである。高温耐性である必要はない。エンドヌクレアーゼは HincII, HindII, AvaI, Fnu4HI, TthIII, および NciI が好ましい。

【0037】本明細書において詳細に説明されたことに加えて、幾つかの代わりのニッキング酵素系を想定することができる。例えば、クラス IIS の制限酵素（例えば、FokI）は一本のポリペプチドユニット内に 2 つの DNA 切断中心を含む。例えば部位特異的変異導入法により、切断中心の一つが不活性化されていれば、その結果生成されるニッキング酵素は、修飾されたデオキシヌクレオシド 3 リン酸を必要とせずに增幅系において使用できるであろう。もう一つの例として、制限酵素 EcoRI は、正規でない認識部位において、または正規の認識部位がオリゴプリン領域によりはざまれている場合に、一方の鎖を選択的に切断することが示された（チャルキング (Thielking) ら、(1990) Biochemistry 29, 4682；レザー (Leisser) ら、(1990) Science 250, \*

\* 776；ベンディッティとウエルズ (Venditti & Wells) (1990) J. Biol. Chem. 266, 16786）。他の例として、制限酵素 DpnI (ニューイングランドバイオラブズ社 (New England Biolabs)、ベバリ、MA から市販されている) は両鎖に methyl dA を含む認識部位を切断する。DpnI または類似の制限酵素は一方の鎖がメチル化された認識部位の鎖を含むメチルにニックを入れることができる。このような系は、未修飾のデオキシヌクレオシド 3 リン酸に沿ってメチル化された認識部位を含む SDA プライマー (P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub>) を用いるであろう。別法として、特定の制限酵素は、一方の鎖がメチル化された認識部位のメチル化されていない鎖を切断することが知られている（例えば、MspI と methyl dC）。このような系は、メチル化されたデオキシヌクレオシド 3 リン酸を使用するであろう。最終的には、複製蛋白質の複製開始点を使用して認識部位の一方の鎖にニックを入れてもよい。

【0038】以下の表は酵素、それらの認識部位およびこの方法に使用するための修飾された dNTP を列挙したものである。

## 【0039】

酵素	認識部位 (5' - 3')	修飾された dNTP
HincII	GTTGAC	dATP ( $\infty$ S)
HincII	GTCAAC	dGTP ( $\infty$ S)
AvaI	CCCGAG	TTP ( $\infty$ S)
AvaI	CTCGGG	dCTP ( $\infty$ S)
NciI	CCGGG	dCTP ( $\infty$ S)
HindII	GTTGAC	dATP ( $\infty$ S)
HindII	GTCAAC	dGTP ( $\infty$ S)
Fnu4HI	GCGGC	dCTP ( $\infty$ S)
BstXI	CCAAACCCCTGG	TTP ( $\infty$ S)
	配列番号：15	
BstXI	CCAGGTTTGG	dCTP ( $\infty$ S)
	配列番号：16	
BsmI	AAAGCATTC	TTP ( $\infty$ S)
BsrI	AACCACT	TTP ( $\infty$ S)
BsaI	GGTCTCTTTTT	dATP ( $\infty$ S)
	配列番号：17	
NlaIV	GGAACC	TTP ( $\infty$ S)
NspI	GCATGT	dCTP ( $\infty$ S)
NspI	GCATGT	dCTP ( $\infty$ S) および dGTP ( $\infty$ S)
PflMI	CCAGGTTTGG	dCTP ( $\infty$ S)
	配列番号：18	
HphI	GGTAGGGATCGTTT	dATP ( $\infty$ S)
	配列番号：19	
AIwI	GGATCGTTTT	dATP ( $\infty$ S)
	配列番号：20	
FokI	GGATGGCAT	
	GTCTTTGGG	dCTP ( $\infty$ S)

## 配列番号：21

A c c I	G T A G A C	d C T P ( $\infty$ S)
A c c I	G T A G A C	T T P ( $\infty$ S)
A c c I	G T A G A C	T T P ( $\infty$ S) および d C T P ( $\infty$ S)
A c c I	G T C T A C	d A T P ( $\infty$ S)
A c c I	G T C T A C	d G T P ( $\infty$ S)
A c c I	G T C T A C	d A T P ( $\infty$ S) および d G T P ( $\infty$ S)
T t h l l l I	G A C C A C G T C	T T P ( $\infty$ S)
T t h l l l I	G A C C A C G T C	T T P ( $\infty$ S) および d G T P ( $\infty$ S)
T t h l l l I	G A C G T G G T C	d C T P ( $\infty$ S)
T t h l l l I	G A C G T G G T C	d C T P ( $\infty$ S) および d A T P ( $\infty$ S)

この方法に有用なポリメラーゼは、5'から3'方向に重合を開始するものを含む。ポリメラーゼはニック下流の重合鎖の置換もすべきであり、そして重要なことはあらゆる5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠いているべきである。ポリメラーゼ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノー断片およびDNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損クレノー断片およびBstポリメラーゼ由来の同様の断片（バイオラッド社、リッチモンド、CA）が有用である。シークエニース1.0およびシークエニース2.0（米国バイオケミカル社）、T5DNAポリメラーゼおよびφ29DNAポリメラーゼも使用される。通常エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼは、その活性がブロッキング剤の添加によりブロックされるとそのような活性を失ったと見なされることは認識すべきである。

【0040】この方法のさらなる特徴は、合成において温度を上げ下げする必要がないことである。多くの增幅法は、温度を上下することにより合成鎖から標的物を解離する必要がある。この方法においては、変成後に单一の温度を使用することができる。非特異的な結合を最少にするために反応温度を十分に高く、しかし標的鎖にプローブが結合する時間を最少にするように反応温度を十分に低く、ストリンジェンシーのレベルを設定すべきである。さらに、適当な温度により酵素活性を十分に保護すべきである。約37°Cから約42°Cが好ましい温度であることが分かった。

【0041】図1において、本発明の一実施例が示されている。この実施例において、鎖Pはプライマーを表し、エンドヌクレアーゼNcIIにより認識される配列CCGGGを5'末端に含む。鎖Tは標的配列であり、これはすでに断片化され、一本鎖にされている。この方法において、プライマーは標的物に結合し、そしてポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド3'リン酸およびαチオ置換デオキシヌクレオシド3'リン酸の存在下においてプライマーから標的物の長さの分伸長合成されるが、標的

物は認識配列を通じて伸長合成される。エンドヌクレアーゼNcIIの存在下において、プライマー鎖はC-G残基間でニックを入れられる。5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼの存在下において、3'末端のニックから伸長合成され、プライマー鎖の下流は、ニックから始まる標的鎖から解離することにより、反応産物が生成され、そして新しい鎖が合成される。要約すれば（示さない）、新たに合成された鎖もエンドヌクレアーゼにより消化され、そしてポリメラーゼがこの鎖を置換合成する反応を停止させるかまたは試薬のうちの一つが使い尽くされるかのいずれかまで繰り返される。

【0042】図2は、2つのプライマーを使用する鎖置換型增幅法（SDA）を描写したものである。第一段階は、規定された5'および3'末端を有する標的DNA断片を生成するためのものである（例えば、制限酵素切断により）。加熱変成後、2つの一本鎖標的断片（T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>）は、過剰に存在するSDA断片（P<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>）それぞれに結合する。P<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>の5'突出部分はニッキング酵素の認識配列を含む。P<sub>1</sub>T<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>T<sub>2</sub>の認識部位の一方の鎖をメチル化するために、DNAポリメラーゼは、3つの修飾されていないデオキシヌクレオシド3'リン酸と1つの修飾されたデオキシヌクレオシド3'リン酸を使用して、二本鎖の3'末端を伸長合成する。ニッキング酵素は一方がメチル化された認識配列の未保護のプライマー鎖にニックを入れ、修飾された相補鎖を完全なまま残す。DNAポリメラーゼはT<sub>1</sub>P<sub>1</sub>上のニックの3'末端から伸長合成し、T<sub>2</sub>と機能的に等価な下流の鎖を置換する。同様にして、P<sub>2</sub>T<sub>2</sub>上のニックからの伸長合成により、T<sub>1</sub>に機能的に等価な下流の鎖が置換される。ニッキングおよび重合／置換段階は、連続的にP<sub>1</sub>T<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>T<sub>2</sub>上で繰り返されるが、それはニックからの置換合成がニックを入れるための認識部位を生成するからである。標的物の増幅は対数的であるが、それはP<sub>1</sub>T<sub>1</sub>から置換された鎖がP<sub>2</sub>のための

標的として作用し、 $P_2 T_2$  から置換された鎖が  $P_1$  のための標的として作用するからである。これらの段階は、增幅が進行する間連続的に繰り返される。例えば、10<sup>6</sup> 倍の増幅は、理論上図2の段階の約20回の繰り返しまたはサイクルによる ( $2^{20} = 10^6$ )。センスDNA鎖とアンチセンスDNA鎖は細線と太線により区別される。

【0043】SDAを使用することにより、塩基配列決定のための一本鎖DNAプローブまたは一本鎖DNAプライマーを生成できる。この目的のために、SDAは、1つのプライマー(図1)または2つのプライマー(図2)を使用して操作されるが、2つのプライマーを用いる場合、一方のプライマー量を他方の量に対して過剰にする。この結果、一方の鎖を置換した産物の量が、他方の鎖を置換した産物の量に比べて過剰になる。

【0044】そして増幅された標的物の存在は、多くのあらゆる方法により検出できる。一つの方法は、ゲル電気泳動による特定のサイズの反応産物の検出である。この方法は使用したヌクレオチドが<sup>32</sup>Pのような放射性標識のときに特に有用である。他の方法はビオチンのような物理的な標識を用いた標識ヌクレオチドの使用を含む。そして反応産物を含むビオチンはペルオキシダーゼのようなシグナルを発する酵素に結合したアビシンにより同定されうる。

【0045】本発明の実施において有用な検出系は、分離を必要としない均一な系および不均一な系からなる。各系において、ひとつまたは複数の検出可能なマーカーが使用され、そして反応または検出系からの放射は、好みしくは自動化された手段により監視される。均一な系の複数の例は、蛍光分極、酵素を使用するイムノアッセイ、蛍光エネルギーの転移、ハイブリダイゼーション保護(例えば、アクリジニウムルミネセンス)およびクローン化されたドナーイムノアッセイを含む。不均一な系の複数の例は、酵素標識(例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびベーターガラクトシダーゼ)、蛍光標識(例えば、酵素による標識および直接の蛍光標識[例えば、フルオレセインおよびローダミン])、ケミルミネセンスおよびバイオルミネセンスを含む。リポソームまたは他の袋状粒子を染色剤および他の検出可能なマーカーで満たし、そしてこのような検出系に使用することもできる。これらの系において、検出可能なマーカーは捕捉モイエティに直接的または間接的に結合できるか、またはリセプターのリガンドにより認識されうるリセプターの存在下において、増幅産物を生成できる。

【0046】以下の実施例は、ここに記述された本発明の特定の態様を例示する。当業者には明らかなどおり、さまざまな変化および修飾は、記述された本発明の目的の範囲内で可能であり、そして予想される。

#### 【0047】

#### 【実施例】

##### 【0048】

【実施例1】この実施例は、増幅前に標的断片を生成するために、Fok I 制限段階を使用した SDA を例示する。アプライドバイオシステムズ社 380B 装置および一次アミンを 3' 末端に取り込む 3'-アミノ-ON CPGカラム(クロントックラボラトリーズ社、パロアルト、CA)を使用して、2つのプライマーを合成した。ヌクレオチドをアンモニウム塩により脱保護し、そして变成ゲル電気泳動により精製した。プライマー配列は、配列番号1および配列番号2であった。

【0049】0.05 mg/ml 大腸菌DNA、5.0 mM 酢酸カリウム、1.0 mM 酢酸マグネシウム、1 mM DTT、12.5 mM TRIS(pH 7.9)により、25°Cにおいて、プラスミド pBR322(ベーリングガーマンハイム社(Boehringer Mannheim)、インディアナポリス、IN)を連続希釈した。1 μg の大腸菌DNAとさまざまな量の pBR322 を含む 20 μl の試料を、10 ユニットの Fok I (ニューアイラングランドバイオラブス社(New England Biolabs)、Beverly, MA) を用いて 37°C において 3 時間消化した。pBR322 / 大腸菌DNA の Fok I 消化物を 12.5 mM 酢酸カリウム、1.0 mM 酢酸マグネシウム、1 mM DTT、25°C の 12.5 mM TRIS(pH 7.9)、1.00 μg/ml BSA、それぞれ 0.3 mM の dATP、dGTP、dTTP、dCTP (φS)(ファルマシア社、ピスカタウエイ、NJ) および 0.1 μM のそれぞれのプライマーにより 100 μl に希釈した。4 ユニットの DNA ポリメラーゼ I の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損クレノー断片(米国バイオケミカル社、クリーブランド、OH) および 48 ユニットの Nci I (ニューアイラングランドバイオラブス社(New England Biolabs)) を添加して、1 セットの試料を 45°C において 4 時間、鎖置換型増幅させた。第二のセットの試料は、未増幅の標準として、ポリメラーゼおよび Nci I を添加せずに反応させた。

【0050】反応産物を検出するため、pBR322 に特異的な検出プローブ、配列番号3を調製し、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて<sup>32</sup>P で標識した。増幅および未増幅の Fok I / pBR322 / 大腸菌DNA 試料の 10 μl アリコートを、2 μl の 1.8 μM <sup>32</sup>P 標識プローブ、0.5 ユニット/μl の Taq DNA ポリメラーゼ(米国バイオケミカル社)と混合した。試料を 95°C において 2 分間、50°C において 5 分間加熱し、50% 尿素で急冷し、そして一部を变成 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて泳動した。増幅反応産物の存在は、43 または 60 ヌクレオチドの長さへの、<sup>32</sup>P 標識検出プローブの伸長合成により検出された。未増幅の Fok I / pBR322 は 40 ヌクレオチドへの

伸長合成により示された。電気泳動の<sup>32</sup>P標識バンドは、適当なバックグラウンドを差し引いて、液体シンチレーションカウンティングにより定量された。結果

\* 果を表1に示す。  
【0051】

表1

# p B R 3 2 2 分子	増幅された場合 (± 50 cpm)	増幅されなかった場合 (± 50 cpm)
$3 \times 10^6$	52900	215
$3 \times 10^7$	18200	24
$3 \times 10^6$	5690	21
$3 \times 10^5$	298	0
0	37	N.D.

N.D.=測定されなかった

表1から理解できるように、アリコートのp B R 3 2 2 DNAの量が減少すると共に1分あたりのカウント数(CPM)も減少する。

## 【0052】

【実施例2】この実施例は、合成一本鎖標的DNA配列を使用したSDAを例示する。合成核酸標的物は、配列番号4を含んで構築された。制限酵素HincII(ニューアイグランドバイオラブズ社)を使用した鎖置換型増幅のためのプライマーは、3'-アミノーオンC P Cカラムを使用して、3'-NH<sub>2</sub>キャップを供給するようにして合成された。使用されたプライマーの配列は、配列番号5および配列番号6であった。

【0053】反応産物の検出のためのプローブは、配列番号7であった。すべての合成配列は、上記のアプライドバイオシステムズ社380B装置により合成され、そして50%尿素を含む10%または15%ポリアクリルアミドゲルにより精製された。切り出されたバンドは1/2×TBE緩衝液中で電気的に溶出された。

【0054】配列番号4を0.3μMのプライマー(即ち、配列番号5および配列番号6)中に希釈することにより、標的物/μlで600,000分子の最終保存濃縮物が供給された。この混合物を3分間沸騰させ、37°Cにおいて静置した。そして、プライマーの存在下においてこの保存溶液の連続4倍の希釈液を調製した。(対照には、増幅プライマーのみが存在する。)

20μlの希釈された保存溶液を混合物に添加することにより、最終体積を60μlにした。成分の最終濃度は以下のとおりである: 20mM TRIS(pH7.2) (25°C)、0.1μMのプライマー配列、20mM

※M硫酸アンモニウム、50mM塩化カリウム、50ユニットのHincII、5ユニットのエキソヌクレアーゼ欠損クレノーポリメラーゼ(米国バイオケミカル社)、1mM DTT、5mM塩化マグネシウム、およびそれぞれ300μMの5'dCTP、5'dGTP、5'dTTPおよび5'dATP(∞S)。増幅反応は、37°Cにおいて1時間または2時間行った。一つの反応セットには、1時間後さらに50ユニットのHincIIを添加し、さらに1時間反応させた。

【0055】反応時間の終了時に各混合物の10μlアリコートを氷上に静置した。この10μlに、<sup>32</sup>Pで標識されたばかりの捕捉プローブの1μM保存溶液を添加した。この混合物を3分間沸騰し、37°Cに冷やし、同時に1μlの1ユニットのシーケエニース2.0(米国バイオケミカル社)を添加した。(この酵素は、捕捉プローブが反応産物に結合している場合、あらゆる反応産物の完全長に沿って捕捉プローブを重合する。)この伸長合成反応は37°Cにおいて15分間行った。この混合物に、50%尿素中の泳動染色液を等量添加した。50%尿素を含む10%ポリアクリルアミドゲルにより泳動する前に、試料を再び3分間沸騰した。最初の60μlの反応混合物のうちの2.5μlに相当する量の試料を泳動した。ゲルを除去した後、59Wにおいて1時間から1.5時間電気泳動を行い、そして-70°Cにおいて一晩フィルム上に置いた。露出後バンドを可視化し、バンドを切り出し、そして液体シンチレーションにより定量化した。

## 【0056】

表2

# 標的物	1時間 (cpm)	2時間 (cpm)	HincIIを添加して2時間 (cpm)
0	0	0	0
2000	N.D.	2	8
8000	4	12	36
30,000	37	78	129
125,000	175	196	746

500,000 824 1858 2665

表2を参照すると、最初の標的物が0から30000の間はSDAがはっきりと違うことが理解できる。

## 【0057】

【実施例3】この実施例は、SDA前にFok I制限消化物を使用している。以下のプライマー配列が使用された：配列番号8および配列番号9。

【0058】これらの配列は、他の実施例のように生成され、プラスミドpBR322内の標的配列を検出するために使用された。

【0059】 $1\mu\text{g}$ のpBR322を、8ユニットのFok Iにより、37°Cにおいて2時間消化し、そして $0.05\text{mg}/\text{ml}$ のヒト胎盤DNAのHph I消化物、 $5.0\text{mM}$ 塩化カリウム、 $2.0\text{mM}$ 硫酸アンモニウム、 $1\text{mM}$ DTTおよび $2.0\text{mM}$ Triton X-100（25°CにおいてpH 7.2）により連続的に希釈した。 $0.5\mu\text{g}$ のヒト胎盤DNAおよびさまざまな量のpBR322を含む $1.0\mu\text{l}$ の試料を、 $5.0\text{mM}$ 塩化カリウム、 $5\text{mM}$ 塩化マグネシウム、 $2.0\text{mM}$ 硫酸アンモニウム、 $1\text{mM}$ DTTおよび $2.0\text{mM}$ Triton X-100（25°CにおいてpH 7.2）、 $1.00\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA、それぞれ $0.1\text{mM}$ のdGTP、dTTP、dCTP（ファルマシア社）、 $0.5\text{mM}$ のdTATP ( $\infty S$ )（ファルマシア社）および $0.1\mu\text{M}$ の各プローブにより $1.00\mu\text{l}$ に\*

\*希釈した。5ユニットのDNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損クレノー断片および50ユニットのHinc IIを添加して、1セットの試料を39°Cにおいて3、5時間、鎖置換型増幅させた。第二のセットの試料は、未増幅の標準として、ポリメラーゼおよびHinc IIを添加せずに反応させた。

【0060】反応産物を検出するため、配列番号7を含むpBR322検出プライマーを $^{32}\text{P}$ で標識して使用した。増幅および未増幅のFok I/pBR322/ヒト胎盤DNA試料の $1.0\mu\text{l}$ アリコートを、 $2\mu\text{l}$ の $1\mu\text{M}$  $^{32}\text{P}$ 標識検出プライマーと混合し、そして95°Cにおいて2分間加熱した。そして2ユニットのシーケエンサー2.0を添加し、試料を37°Cにおいて5分間インキュベートした。試料を50%尿素により急冷し、そして变成10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて泳動した。増幅反応産物の存在は、54または75ヌクレオチドの長さへの、 $^{32}\text{P}$ 標識検出プライマーの伸長合成により検出された。未増幅のFok I/pBR322は50ヌクレオチドへの伸長合成により示された。 $^{32}\text{P}$ 標識バンドの電気泳動は、適当なバックグラウンドバンドを差し引いて、液体シンチレーションカウンティングにより定量された。結果を表3に示す。

## 【0061】

表3

# pBR322分子	増幅された場合 (± 10 cpm)	増幅されなかった場合 (± 10 cpm)
$10^9$	ND	1963
$10^8$	ND	257
$10^7$	ND	ND
$10^6$	135408	ND
$10^5$	13841	ND
$10^4$	2324	ND
$10^3$	380	ND
0	139*	ND

ND=測定されなかった

\* pBR322分子を添加しなかった増幅産物は、不注意によるpBR322の混入により、標的物に特異的なバンド（54マーおよび75マー）を僅かに生じた。

【0062】 $10^9$ および $10^8$ のpBR322分子を用いて増幅されなかった場合の試料と、 $10^4$ および $10^3$ のpBR322分子を用いて増幅された場合の試料との比較から、 $10^4$ 以上の増幅率が示唆される。さらに、緩衝液の組成とデオキシヌクレオシド3'リン酸の濃度を調整することにより、増幅効果が改良されることがわかった。硫酸アンモニウムを含有し、相対的に低いpHおよびdTATP ( $\infty S$ ) : dGTPの率が5:1のときに、増幅効果を高めることがわかった。

【0063】本発明は、特定の修飾に関して記述された

が、それらの詳細は限定されるものではなく、本発明の精神および目的の範囲内でさまざまな相当物、変化および修飾を用いてよいことは明らかであり、そのような相当する態様はここに含まれるべきことが理解される。

【0064】本明細書において引用された刊行物および特許出願は、本発明の属する分野の当業者のレベルを示す。すべての刊行物および特許出願は、引用により本明細書の一部をなす。

【0065】請求項の趣旨または目的から離れることなく、本発明の範囲において多くの変化および修飾がされることには当業者には明らかである。

## 【0066】

【配列表】配列番号：1

21

22

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列

TCATTTCTTA CTTTACCGGG AAAAATCACT CAGGGCTCAA 39

配列番号：2

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCATTTCTTA CTTTACCGGG ACCCTCTCGA ACACCTACAT 40

配列番号：3

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCACCGCTTC GTTAATACA 19

配列番号：4

配列の長さ：62

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

ACCCCTGTGGA ACACCTACAT CTGTATTAAC GAACCGCTCG CATTGACCCCT GACTGATTTC 60

TC 62

配列番号：5

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GGATATTTAT TGTGACTTA CCCTCTGGAA CAC 33

配列番号：6

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：un sure

存在位置：1..35

\* 40 特徴を決定した方法：E

配列

GGAATAATAA TATGTTGACT TGAAAAATCA CTCAG 35

配列番号：7

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ACATCTGTAT TAACGAAGCG 20

配列番号：8

50 配列の長さ：41

\* 配列の特徴

特徴を表す記号：un sure

存在位置：1..39

特徴を決定した方法：E

\*

※ 配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

10 特徴を表す記号：un sure

存在位置：1..40

※ 特徴を決定した方法：E

配列

TCATTTCTTA CTTTACCGGG ACCCTCTCGA ACACCTACAT 40

★ 配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：un sure

存在位置：1..19

★ 特徴を決定した方法：E

配列

CCACCGCTTC GTTAATACA 19

☆ 配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：un sure

存在位置：1..62

☆ 特徴を決定した方法：E配列

TC

◆ 配列の種類：他の種類 合成DNA

30 配列の特徴

特徴を表す記号：un sure

存在位置：1..33

◆ 特徴を決定した方法：E

配列

GGATATTTAT TGTGACTTA CCCTCTGGAA CAC 33

\* 配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：un sure

存在位置：1..35

\* 40 特徴を決定した方法：E

配列

GGAATAATAA TATGTTGACT TGAAAAATCA CTCAG 35

※ 配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：un sure

存在位置：1..20

※ 特徴を決定した方法：E

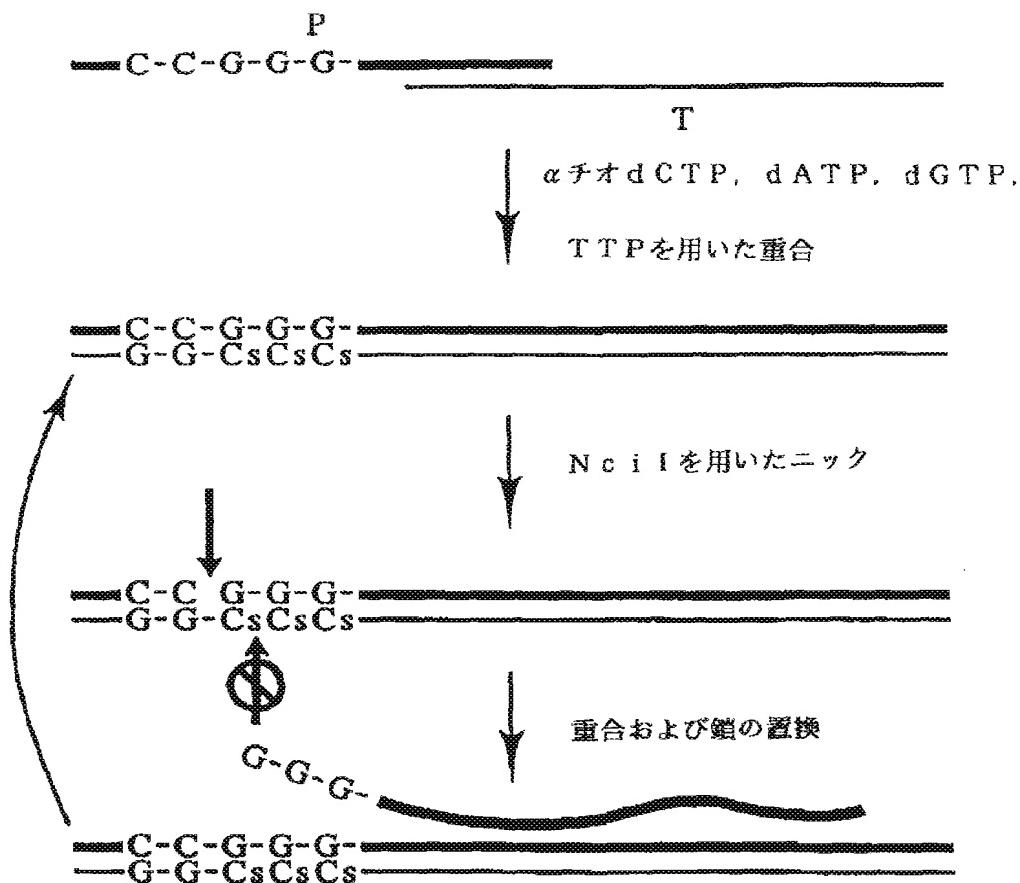
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の種類 合成DNA

\* 配列の特徴  
特徴を表す記号：un sure  
存在位置：1..41  
\* 特徴を決定した方法：E

配列  
TTCAACTAAC CGACTATTCT TGACTACCCCT GTGGAACACCC T 41  
配列番号：9  
配列の長さ：43  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列  
TTGAATAGTC GGTTACTTGT TGACTCAGAG AAAAATCACT CAG 43  
10 存在位置：1..43  
※ 特徴を決定した方法：E

【図面の簡単な説明】  
【図1】図1は、本発明における一本鎖DNA断片に対する方法の一例を示す工程のフローチャートである。★  
★【図2】図2は、本発明における二本鎖ゲノミックDNAに対する方法の一例を示す工程のフローチャートである。

【図1】



【図2】

## 標的制限断片

